

PCT/JP2004/010621

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

28.07.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 7月30日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-282375
[ST. 10/C]: [JP2003-282375]

REC'D 16 SEP 2004	
WIPO	PCT

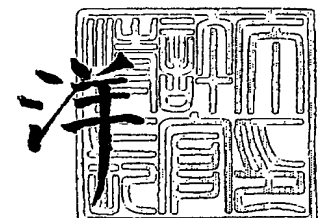
出 願 人
Applicant(s): 星野 友昭

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03AC007
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/531
C07K 14/715
【発明者】
 【住所又は居所】 福岡県筑紫野市美しが丘南 1 - 8 - 7
 【氏名】 星野 友昭
【特許出願人】
 【識別番号】 500258477
 【氏名又は名称】 星野 友昭
【代理人】
 【識別番号】 100113044
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 木島 智子
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 175973
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α 。

【請求項 2】

下記 (A) の抗体を用いることを特徴とする、酵素免疫測定法による可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α の測定方法。

(A) H44 マウス抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体

【請求項 3】

(A) が以下の (a) であることを特徴とする、請求項 2 記載の可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α の測定方法。

(a) H44 マウス抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、マウス抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体

【請求項 4】

(a) が、以下の (a1) ~ (a3) のいずれかであることを特徴とする、請求項 3 記載の可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α の測定方法。

(a1) H44 マウス抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体

(a2) MAB840 マウス抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体

(a3) 117-10C マウス抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体

【請求項 5】

もう一方の抗体が、以下の (B) であることを特徴とする、請求項 2 乃至 4 のいずれかに記載の可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α の測定方法。

(B) 抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α ポリクローナル抗体

【請求項 6】

(B) が以下の (b) であることを特徴とする、請求項 5 記載の可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α の測定方法。

(b) ラビット抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α ポリクローナル抗体

【請求項 7】

下記 (1) の抗体を固層化した第一次抗体と、下記 (2) の第二次抗体とを用い、可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α を検出することを特徴とする請求項 7 記載の可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α の測定方法。

(1) 抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体

(2) 抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α ポリクローナル抗体

【請求項 8】

請求項 2 乃至 7 のいずれかに記載の可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α の測定方法を用いることを特徴とする、自己免疫疾患の診断方法。

【請求項 9】

下記の (A) の抗体を、固層化抗体又は標識化抗体として含有することを特徴とする、可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α 測定用キット。

(A) H44 マウス抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体

【請求項 10】

一方が固層化され、他方が標識化された (1) 及び (2) 2 種の抗体を含有することを特徴とする、可溶化ヒトインターロイキン 18 レセプター α 測定用キット。

(1) マウス抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α モノクローナル抗体

(2) ラビット抗ヒトインターロイキン 18 レセプター α ポリクローナル抗体

【書類名】明細書

【発明の名称】可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 及びその測定方法並びに測定用キット

【技術分野】**【0001】**

本発明は、ヒトインターロイキン18レセプターの作用解明、間質性肺炎や感染、関節リウマチ等の自己免疫疾患等の治療薬等に使用することが期待される可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 及びその測定方法、リュウマチ等の自己免疫疾患の診断方法並びに測定用キットに関する。

【背景技術】**【0002】**

従来、インターロイキン2については、可溶化ヒトインターロイキン2レセプター α の存在が確認され、またその検出手段として、2カ所の異なるエピトープを認識する2種のモノクローナル抗体を使った酵素免疫測定法（ELISA法）が使用されている。

【0003】

【非特許文献1】PHARMINGEN OptEIA (TM) Human IL-2sR α (CD25) Set カタログ (Catalog #559104) (2000.8.17, PHARMINGEN, San Diego, CA, USA発行)

【0004】

しかしながら、インターロイキン18（以下IL-18と記載する。）に関しては、可溶化レセプターの存在は、知られていなかった。

【0005】

本発明者は、可溶化ヒトIL-18レセプター α が存在するとの考えに基づき、ELISA法を用いて検出を試みてきた。そして用いる2種類の抗体（capture「捕獲」抗体、detect「検出」抗体）としては、可溶化前のヒトIL-18レセプター α と可溶化ヒトIL-18レセプター α との構造の類似性から、ヒトIL-18レセプター α の既存のモノクローナル抗体を候補として選択した。しかしながら、既存のモノクローナル抗体は、ヒトIL-18レセプター α を認識する際の結合部位となるエピトープが共通すると考えられており、2種類の既存のモノクローナル抗体を用いたいわゆるサンドイッチ法を用いて検出することは不可能であった。

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

本発明者等は、上述の問題を解決するべく研究を重ねた結果、本発明を完成したものであって、その目的とするところは、可溶化ヒトIL-18レセプター α を認識し、かつエピトープの共通しない抗体の組み合わせを選択し、それを用いたELISA法を提供すること及び、その方法によって、可溶化ヒトIL-18レセプター α の存在を確認すること、更には、測定用キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0007】**

上述の目的は、可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 、下記（A）の抗体を用いることを特徴とする、酵素免疫測定法による可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法、（A）が以下の（a）であることを特徴とする、当該可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法、（a）が、以下の（a1）～（a3）のいずれかであることを特徴とする、当該可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法、もう一方の抗体が、以下の（B）であることを特徴とする、当該可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法、（B）が以下の（b）であることを特徴とする、当該可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法、下記（1）の抗体を固層化した第一次抗体と、下記（2）の第二次抗体とを用い、可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α を検出することを特徴とする当該可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法、当該いずれかの可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定

方法を用いることを特徴とする、自己免疫疾患の診断方法、及び下記の(A)の抗体を、固層化抗体又は標識化抗体として含有することを特徴とする、可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 測定用キット、並びに、一方が固層化され、他方が標識化された(1)及び(2)2種の抗体を含有することを特徴とする、可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 測定用キットによって達成される。

【0008】

(A) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
(a) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体

- (a1) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
- (a2) MAB840マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
- (a3) 117-10Cマウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
- (B) 抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体
- (b) ラビット抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体
- (1) 抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
- (2) 抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体

【0009】

尚、以下において、「ヒトインターロイキン18レセプター α 」を、「hIL-18R α 」, 「可溶化(soluble)ヒトインターロイキン18レセプター α 」を、「shIL-18R α 」と記載することがある。

【発明の効果】

【0010】

本発明のshIL-18R α は、IL-18及びIL-18Rシグナルの作用解明、間質性肺炎や感染等の治療薬等に使用することが期待される。また、本発明のshIL-18R α の測定方法は、今まで不可能であった、shIL-18R α の測定ができる点で有意義である。また、本発明の診断方法によって、リュウマチ等の自己免疫疾患の診断が可能となる。更に、本発明のキットは、測定が簡便であり、医療現場で非常に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明において、酵素免疫測定法の一方向の抗体として用いられる、(A) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体(以下、H44マウス抗hIL-18R α と記載する。)と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体としては、マウス、ラット、ラビット、ヒトもしくはハムスター抗体が挙げられるが、(a)マウス抗体が好ましく、具体的には、以下の3種類が例示される。

(a1) H44マウス抗hIL-18R α

(a2) MAB840マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体(R&D Systems社製, Minneapolis, MN, USA, 以下、MAB840マウス抗hIL-18R α と記載する。)

(a3) 117-10Cマウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体(Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.社製, Okayama, Japan, 以下、117-10Cマウス抗hIL-18R α と記載する。)

これらは、もう一方に用いられる、マウス、ラット、ラビット、ヒトもしくはハムスター抗hIL-18R α モノクローナル抗体又は後述のポリクローナル抗体と、異なるエピトープを認識し得るものであれば良い。

【0012】

(a1) H44マウス抗hIL-18R α は公知のモノクローナル抗体であり、Pharmingen, Serotec, eBioscienceから入手可能である。

【0013】

(a 2) MAB840マウス抗hIL-18R α は公知のモノクローナル抗体であり、R&D Systemsから入手可能である (R&D Systems Catalog No.MAB840)。

【0014】

(a 3) 117-10C抗hIL-18R α は公知のモノクローナル抗体であり、Hayashibara Biochemical Laboratories Inc. から入手可能である (J. Biol. Chem. Vol.272, No.41, Issue of October 10, pp.25737-25742, 1997)。

【0015】

本発明において用いられる抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体とは、公知のポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体とは、異なるエピトープを認識し得る抗体の集合体であり、ポリクローナル抗体全体としては、種々のエピトープの認識が可能である。従って、この本発明で用いる抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体は、上述のモノクローナル抗体とは、異なるエピトープを認識することができ、またその認識するエピトープの位置が、抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体の認識するエピトープの位置と、立体障害の起こりにくい位置にあると予想される。

【0016】

本発明の測定方法においては、上述の (A) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体 (以下、H44マウス抗hIL-18R α と記載する。) と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体以外にも、(1) 抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体を用いることができるが、その際には、当該抗体が認識するエピトープと、異なるエピトープを認識し得るモノクローナル抗体や、(2) 抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体等を用いることができる。

【0017】

(1) としては、マウス抗体が好ましく、(2) としては、ラビット抗体が好ましい。

【0018】

尚、このラビット抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体は、瀬谷先生 (大阪成人病センター、Koizumi H, Sato-Matsumura KC, Nakamura H, Shida K, Kikkawa S, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T. Distribution of IL-18 and IL-18 receptor in human skin: various forms of IL-18 are produced in keratinocytes. Arch Dermatol Res 2001;293:325-333.) から入手可能である。

【0019】

本発明のshIL-18R α の測定方法においては、上記のモノクローナル抗体のうち一種と、上記のポリクローナル抗体を用いることができ、いずれを第一次抗体としても良いが、capture抗体として固層化するためには、選択性の高い、モノクローナル抗体を用いることが好ましい。従って、本発明の生体試料中のshIL-18R α 測定用キットにおいても、第一次抗体として、上記いずれかのモノクローナル抗体を固層化したものを用いることが好ましい。

【0020】

本発明において、第一次抗体の固層化対象には、ガラス、プラスチック、微粒子、磁性微粒子、の不溶性物質を利用することができ、その形状もチューブ等の器壁、ビーズ、蛋白性微粒子、鉄製微粒子、マイクロプレート、イムノクロマトグラフィー用濾紙、ガラスフィルター等とすることができるが、マイクロプレートが一般的である。

【0021】

本発明において、第二次抗体として用いられる抗体は、例えば次のような方法で検出することができる。

第二次抗体に、ビオチンを結合させておき、サンドイッチ法の実施後に、ストレプトアビジン結合西洋ワサビペルオキシダーゼを添加し、ビオチンにアビジンを結合させる。西洋ワサビペルオキシダーゼの酵素基質を加え、その酵素活性を測定することで、サンドイッチ法により捕捉された可溶化ヒトIL-18レセプター α を測定する。

このほか、第二次抗体の標識には、公知の放射性アイソトープ、酵素、蛍光物質、化学発光物質、着色物質等を利用することもできる。

【0022】

本発明の自己免疫疾患の診断方法は、上記の可溶性ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法を用いて実施することができる。

自己免疫疾患としては、関節リュウマチ、間質性肺炎、膠原病等が挙げられる。

【0023】

本発明のshIL-18R α 測定用キットには、第一次抗体と第二次抗体の他、固層化対象、標識、緩衝液等を適宜組み合わせることができる。また、本発明のshIL-18R α 測定用キットには、更に、抗体から、shIL-18R α 抗原を遊離させるための酸溶液（例えばpH3.0, 25 mM Glycine, 150 mM NaCl等）を加えることもできる。

【0024】

本発明のshIL-18R α の測定方法及びshIL-18R α 測定用キットは、生体試料中のshIL-18R α 測定のほか、試験管レベルのshIL-18R α 測定にも使用することができる。

【実施例1】

【0025】

(ELISA法による血清又はBAL中shIL-18R α 抗原の確認)

PBS緩衝液に溶解した4 μ g/mlのH44マウス抗hIL-18R α を、ELISA plate(Nunc製)に100 μ l/well分注し、4℃で一晩置き、第一次抗体であるH44マウス抗hIL-18R α を、プレートに固層化した後、0.5%のTwin20(界面活性剤)を含むPBS緩衝液200 μ lで2回洗浄した。

【0026】

第二次抗体のプレートへの非特異的接着防止のため、のBlock Ace(大日本製薬製)を200 μ l/well添加し、室温で2時間置き、ブロッキングを行った後、再び、0.5%のTwin20を含むPBS緩衝液200 μ lで2回洗浄した。尚、室温で2時間に変えて、4℃で一晩置いても良い。

【0027】

被検試料である、血清(4倍希釈)及びBAL(気管支肺胞洗浄液の原液)を、各々100 μ l/well分注した。また、標準のhIL-18R α 抗原溶液として、recombinant human IL-18R α (R&D製)100 μ g/mlを希釈して、種々の倍率の希釈溶液を作成し、同様にそれぞれ別のwellに分注した。分注後、室温で2時間後、第一次抗体に、標準hIL-18R α 抗原又は血清及びBAL中のshIL-18R α 抗原を結合させた後0.5%のTwin20を含むPBS緩衝液200 μ lで各wellを3回洗浄した。

【0028】

次に、40%のBlock Aceに2 μ g/mlの濃度となるように溶解した、第二次抗体であるビオチン結合ラビット抗hIL-18R α ポリクローナル抗体溶液を、100 μ l/well分注し、室温で90分置き、第二次抗体をshIL-18R α 抗原に結合させた後、0.5%のTwin20を含むPBS緩衝液200 μ lで各wellを4回洗浄した。

【0029】

0.5 μ g/mlのストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを、各wellに100 μ lずつ添加し、室温で30分間置き、ビオチンにアビジンを結合させた後、0.5%のTwin20を含むPBS緩衝液200 μ lで各wellを5回洗浄した。

【0030】

西洋ワサビペルオキシダーゼの酵素基質であるABTS(ELISA POD Substrate A.B.T.S Kit, ナカライ, 京都)を100 μ l/well加え、室温で30分間置き、酵素反応を起こさせた後、停止液100 μ l/wellを加えて酵素反応をストップさせた。

【0031】

450nm(main)及び650nm(sub)の吸光度を測定し、標準hIL-18R α 抗原の量と比較することによって、被検試料である、血清及びBAL中の、shIL-18R α の量を測定した。

健常人の血清中のshIL-18R α は159.2+-89.5 ng/ml (n=45)であった。また関節リュウマチ (RA) 患者の血清中shIL-18R α は233.5+-109.2 ng/ml (n=34)であった。リュウマチ (RA) 患者の血清中shIL-18R α は健常人の血清より有意に高かった(p=0.00216, unpaired Student t-test)。また間質性肺炎患者のBAL中のshIL-18R α は2.2+-1.5 ng/ml (n=33)であった。

このことは、血清やBAL液中の、shIL-18R α の存在を示している。また、健常人に比べて、リュウマチ患者で、血清中のshIL-18R α が明らかに多かったことから、本発明のshIL-18R α の測定方法が、リュウマチ等の病気の診断方法として有用であることが分かった。

【0032】

(血清中shIL-18R α 抗原の存在の確認及び親和性確認試験)

H44 マウス抗hIL-18R α 抗体をHiTrap NHS-activated HPカラム (Pharmacia Biotech Ab, Uppsala, Sweden) にカップリングしヒト血清をこのアフィニティカラムを用いてアフィニティカラムクロマトグラフィにかけ、親和性を確認した。結合バッファーは10 mM phosphate buffer pH6.8, 洗浄バッファーは10 mM phosphate buffer, 50 mM NaCl, pH6.8, 溶出バッファーは100 mM glycine buffer pH2.5, 中和バッファーは1M phosphate buffer pH8.0を用いた。ヒト血清サンプルを結合バッファーで2倍希釈し0.45 μ m filterで濾過し、結合バッファーであらかじめ平衡化したH44 マウス抗hIL-18R α 抗体アフィニティカラムにかけた。洗浄バッファーでアフィニティカラムを洗浄する。溶出バッファーをカラムに流し、溶出バッファー1mlごとに50 μ l中和バッファーの入ったチューブに入れて回収(回収順にFraction番号1, 2, 3...とする)しUV280nmでモニターした。回収したFractionを4℃でPBS緩衝液で透析した。UV280nmでモニターはFraction番号1-8でそれぞれ0.0687, 0.3598, 0.7073, 0.0949, 0.0377, 0, 0, 0だった。透析したFraction番号1-8を、上述のサンドイッチELISA法でshIL-18R α を測定したところ、<200, 1797, 1778, 1259, <200, <200, <200, <200 ng/mlであった。つまりFraction番号2, 3, 4にshIL-18R α が存在することが確認できた。このようにヒト血清から採取したshIL-18R α は、H44 マウス抗hIL-18R α 抗体アフィニティカラムクロマトグラフィにかけて、親和性を確認した。

【0033】

(ウェスタンブロッティングによる抗原特異性及び分子量確認試験)

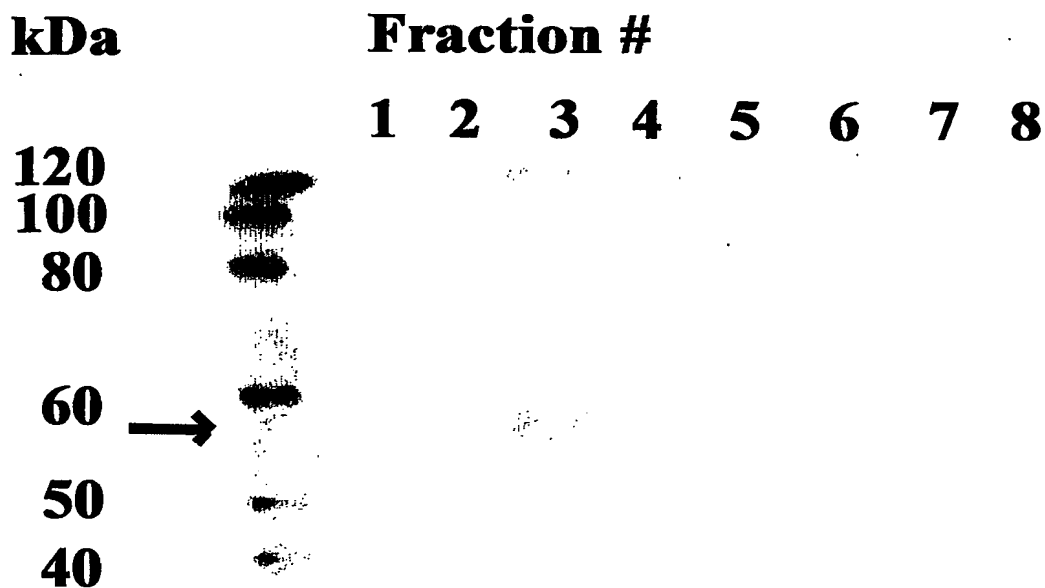
上記で透析したFraction番号1-8を、H44 マウス抗hIL-18R α 抗体を用いてウェスタンブロッティングで解析した。図1に示すようにFraction番号2, 3, 4に約60 kDaの分子量にH44 マウス抗hIL-18R α 抗体が認識するshIL-18R α の存在が確認された(Fraction番号4のものも、添付図面では、影が薄いが確認されている)。この結果は上記のアフィニティカラムクロマトグラフィ、サンドイッチELISA法の結果と一致した。以上の結果から、血清に確かにshIL-18R α が存在していることが、確認された。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】ウェスタンブロッティングによる、透析試料の抗原特異性及び分子量確認結果を表す図である。

【書類名】 図面
【図 1】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】要約書

【要約】

【課題】ヒトIL-18レセプター α を認識し、かつエピトープの共通しない抗体の組み合わせを選択し、それを用いたELISA法を提供すること、及び可溶化ヒトIL-18レセプター α の存在を確認すること、更には、測定用キットを提供することである。

【解決手段】可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 、及び、下記(A)の抗体を用いることを特徴とする、酵素免疫測定法による可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法、並びに下記の(A)の抗体を、固層化抗体又は標識化抗体として含有することを特徴とする、可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 測定用キットである。

(A) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体

【選択図】なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 2 8 2 3 7 5
受付番号	5 0 3 0 1 2 5 9 8 7 9
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 5 年 7 月 3 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 7月30日

特願 2 0 0 3 - 2 8 2 3 7 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 0 2 5 8 4 7 7]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 4 月 2 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県筑紫野市美しが丘南 1 - 8 - 7

氏 名

星野 友昭